

УДК 615.014.07:615.322:615.254.1  
DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2016.v0.i3.6944

О. Г. Дорошенко, С. М. Марчишин

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

## ФІТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗБОРУ ДІУРЕТИЧНОГО

*Вивчено хімічний склад збору діуретичного. Встановлено наявність та визначено кількісний вміст речовин фенольного характеру: флавоноїдів, кислот гідроксикоричних, кумаринів. Методом високо-ефективної рідинної хроматографії ідентифіковано хлорогенову, розмаринову, ферулову кислоти, рутин, гіперозид, ізокверцитрин, лютеолін, апігенін, кумарин, умбеліферон і скополетин, встановлено їх кількісний вміст.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** збір діуретичний, флавоноїди, кислоти гідроксикоричні, кумарини.

**ВСТУП.** Лікування пацієнтів із захворюваннями нирок і сечовидільної системи є однією з найскладніших проблем у сучасній урологічній практиці. Фармакотерапія даних захворювань включає широкий спектр лікарських препаратів різних фармакологічних груп. Необхідність тривалого консервативного лікування багатьох захворювань нирок і сечовидільної системи спонукає до пошуку та використання лікарських засобів рослинного походження з полівалентним фармакологічним ефектом. Дану проблему можна успішно вирішити, використовуючи багатокомпонентні рослинні збори. До складу таких зборів включають лікарські рослини, які проявляють протизапальну, антимікробну, імуномодельную, нефропротекторну, діуретичну активність [2].

Ми запропонували збір лікарських рослин, до складу якого входять: трава споришу, трава суниці, листя горіха, листя мучниці, листя кропиви, кореневища і корені пирію, квітки цмину. Попередні дослідження показали, що досліджуваний збір у дозі 10 мл/кг чинить сечогінну та нефропротекторну дію [5].

Метою даної роботи було дослідити якісний склад і визначити кількісний вміст сполук фенольної природи у зборі діуретичного.

За даними джерел літератури, діуретичну активність проявляють такі групи біологічно активних речовин: флавоноїди, кислоти фенолкарбонові, кумарини, монотерпеноїди, полісахариди, деякі макроелементи [2].

© О. Г. Дорошенко, С. М. Марчишин, 2016.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** У зборі діуретичному за допомогою реакцій ідентифікації і методів хроматографічного аналізу виявлено та визначено кількісний вміст флавоноїдів і кислот гідроксикоричних.

Попередньо на вміст флавоноїдів вивчали спиртово-водну витяжку. Позитивні результати ціанідинової проби (поява рожевого кольору), реакції з 10 % спиртово-водним розчином калію гідрооксиду (жовте забарвлення) та з 10 % розчином плюмбуму ацетату (утворення осаду жовтого кольору) свідчили про наявність флавоноїдів у досліджуваному об'єкті [6].

Ідентифікацію флавоноїдів у досліджуваному зборі проводили також методом ТШХ у системі розчинників н-бутанол – кислота ацетатна – вода очищена Р (4:1:2). Хроматограми висушували та розглядали при денному й УФ-світлі до та після обробки парами амоніаку. Використовували достовірні зразки: кемпферол, гіперозид, кверцетин, рутин, лютеолін, ізокверцитрин, апігенін.

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин та абсолютно суху сировину у відсотках визначали спектрофотометричним методом [6].

Для виявлення кислот гідроксикоричних використовували спиртово-водний екстракт та проводили реакцію з ферум (III) хлоридом: спостерігали зелено-сіре забарвлення, яке свідчило про наявність у досліджуваних об'єктах сполук фенольної природи.

Для виявлення кислот гідроксикоричних також використовували методи ПХ, застосову-

ючи папір Filtrak FN № 4. Для цього досліджуваний екстракт наносили на хроматографічний папір, поряд наносили стандартні зразки (кислоти розмаринова, неохлаорогенова, хлорогенова, кофейна та ферулова) і поміщали хроматограму в систему розчинників н-бутанол – кислота ацетатна – вода очищена Р (4:1:2). Хроматограму висушували у витяжній шафі й розглядали при денному та УФ-світлі до і після обробки парами амоніаку та 3 % розчином ферум (III) хлориду.

Кислоти гідроксикоричні в УФ-світлі набували блакитного забарвлення різної інтенсивності, яке посилювалося під дією парів амоніаку, що характерно для похідних кислоти коричної.

Кількісне визначення кислот гідроксикоричних у зборі діуретичному проводили спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Lambda 25 UV, вимірюючи оптичну густину при довжині хвилі 327 нм, перерахунок вели на кислоту хлорогенову [1].

Флавоноїди, кислоти гідроксикоричні та кумарини ідентифікували методом ВЕРХ на хроматографі Agilent 1200 3 D LC System Technologies (США).

Аналіз кислот гідроксикоричних та кумаринів здійснювали обернено-фазною хроматографією з використанням хроматографічної колонки SupelcoDiscovery C<sub>18</sub> розміром 250×4,6 мм із сорбентом силікагелем, модифікованим октадецильними групами, який має діаметр зерен 5 мкм.

Хроматографування проводили у градієнтному режимі елюювання: 0 хв 5 % "В", 8 хв 8 % "В", 15 хв 10 % "В", 30 хв 20 % "В", 40 хв 40 % "В", 41–42 хв 75 % "В", 43–50 хв 5 %, рухома фаза – 0,005 Н фосфорна кислота (А) й ацетонітрил (В). Режим хроматографування: максимальна швидкість подачі рухомої фази – 0,7 л/хв, робочий тиск елюенту – 100–120 бар (10 000–12 000 Па); температура термостата колонки – 25 °С; об'єм введеної проби – 5–20 мкл, час хроматографування – 50 хв. Час сканування – 0,6 с, діапазон детектування – 190–400 нм, довжина хвилі – 320, 330 нм.

Пробопідготовку проводили таким чином: зважували подрібнену сировину збору діуретичного 5,00 г (точна наважка), поміщали в круглодонну колбу об'ємом 100 мл, екстрагували 50 мл 60 % метанолу на киплячій водяній бані зі зворотним холодильником при перемішуванні протягом 15 хв. Після цього пробу обробляли ультразвуком протягом 10 хв, фільтрували, кількісно переносили в колбу на 100 мл і доводили до мітки розчинником (60 % метанолом). Перед хроматографуванням фільтрували через фільтр одноразового використання з діаметром пор 0,45 мкм [4, 7, 9].

Режим хроматографування при визначенні флавоноїдів: максимальна швидкість подачі рухомої фази – 0,8 мл/хв, робочий тиск елюенту – 156 бар; температура термостата колонки – 25 °С; об'єм введеної проби – 5–20 мкл, час хроматографування – 60 хв. Градієнтний режим елюювання: 0 хв 12 % "В", 30 хв 25 % "В", 33 хв 25 % "В", 38 хв 30 % "В", 40 хв 40 % "В", 41 хв 80 % "В", 49 хв 12 %. Час сканування – 0,6 с, діапазон детектування – 190–400 нм, довжина хвилі – 255, 340 нм.

Пробопідготовку проводили таким чином: зважували подрібнену сировину збору діуретичного 5,00 г (точна наважка), поміщали в круглодонну колбу об'ємом 50 мл, додавали 25 мл 60 % розчину метанолу, 2 мл розчину фосфорної кислоти Р і бідистильованої води (1:10), рН=2,8, екстрагували на киплячій водяній бані зі зворотним холодильником при перемішуванні протягом 30 хв. Перед хроматографуванням фільтрували через фільтр одноразового використання з діаметром пор 0,45 мкм [3, 8].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Позитивні результати якісних реакцій показали наявність у зборі діуретичному сполук флавоноїдної природи. Наступним етапом ідентифікації флавоноїдів у досліджуваному об'єкті була ТШХ. Результати ТШХ-аналізу показали, що збір діуретичний містить рутин, ізокверцитрин, гіперозид, лутеолін (рис. 1).

Методом ПХ у спиртово-водному екстракті збору діуретичного виявлено 4 кислоти гідроксикоричних – хлорогенову, неохлаорогенову, ферулову і розмаринову (рис. 2).

Спектрофотометричним методом встановлено, що збір діуретичний у найбільшій кількості

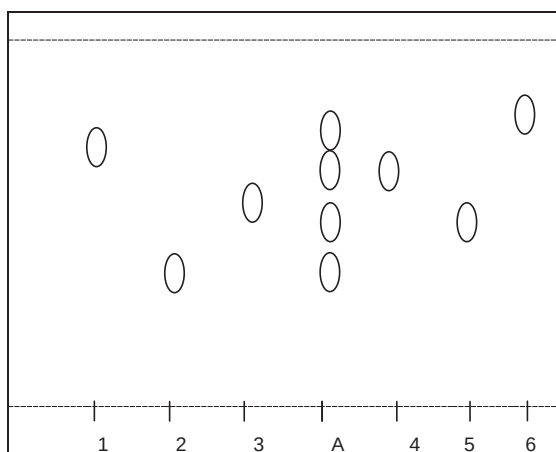


Рис. 1. Схема хроматограми спиртово-водного екстракту збору діуретичного: А – екстракт збору діуретичного; 1 – гіперозид; 2 – рутин; 3 – кверцетин; 4 – лутеолін; 5 – ізокверцитрин; 6 – кемпферол.

Система розчинників: н-бутанол – кислота ацетатна – вода очищена Р (4:1:2).

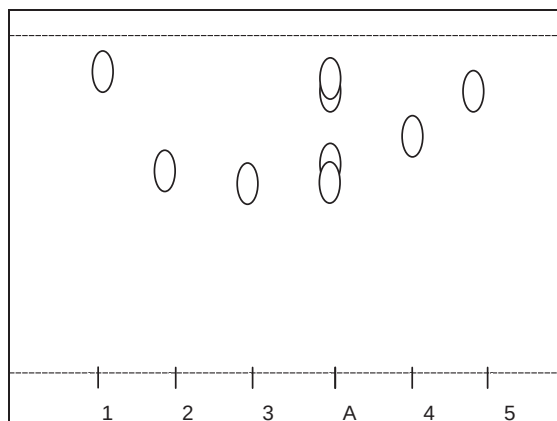


Рис. 2. Схема хроматограми спиртово-водного екстракту збору діуретичного: А – екстракт збору діуретичного; 1 – кислота розмаринова; 2 – кислота неохлорогенова; 3 – кислота хлорогенова; 4 – кислота кофейна; 5 – кислота ферулова.

Система розчинників: н-бутанол – кислота оцтова – вода очищена Р (4:1:2).

містить кислоти гідроксикоричні –  $(3,75 \pm 0,004) \%$ , дещо менше флавоноїдів –  $(1,02 \pm 0,006) \%$ .

Результати ВЕРХ-аналізу показали, що збір діуретичний містить хлорогенову, розмаринову, ферулову кислоти, рутин, гіперозид, ізокверцитрин, лютеолін, апігенін, кумарин, умбеліферон і скополетин (табл.).

Встановлено, що в найбільшій кількості досліджуваний збір містить ізокверцитрин (0,52 %) і рутин (0,38 %).

**ВИСНОВКИ.** 1. Проведено фітохімічний аналіз збору діуретичного та встановлено наявність таких речовин фенольної природи: флавоноїдів, кислот гідроксикоричних, кумаринів.

2. У зборі діуретичному визначено кількісний вміст флавоноїдів – 1,02 % і кислот гідроксикоричних – 3,75 %.

3. Методом ВЕРХ у зборі діуретичному ідентифіковано та визначено кількісний вміст індивідуальних речовин: хлорогенової, розмаринової, ферулової кислот, рутина, гіперозиду, ізокверцитрину, лютеоліну, апігеніну, кумарину, умбеліферону і скополетину. Домінують ізокверцитрин (0,52 %), рутин (0,38 %); кислота хлорогенова (0,14 %), кумарин (0,31 %) та умбеліферон (0,16 %).

4. Результати досліджень, а також досвід народної медицини та гомеопатії свідчать про доцільність вивчення біологічно активних речовин і проведення фармакологічного вивчення збору діуретичного з метою використання його для профілактики та лікування захворювань нирок і сечовидільної системи.

Таблиця – Вміст індивідуальних фенольних сполук у зборі діуретичному (метод ВЕРХ)

Назва речовини	Вміст, %
Флавоноїди	
Гіперозид	0,08
Рутин	0,38
Ізокверцитрин	0,52
Лютеолін	0,08
Апігенін	0,11
Кумарини	
Кумарин	0,31
Умбеліферон	0,16
Скополетин	0,01
Кислоти гідроксикоричні	
Хлорогенова	0,14
Розмаринова	0,03
Ферулова	0,08

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурлака І. С. Дослідження гідроксикоричних кислот *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth. / І. С. Бурлака, В. С. Кисличенко // Вісн. фармації. – 2013. – № 1 (73). – С. 51–53.

2. Лекарственные растения, почки и обмен мочевой кислоты / С. Ю. Штрыголь, О. В. Товчига, О. О. Койро, С. И. Степанова. – Харьков : Титул, 2014. – С. 56–62.

3. Определение флавоноидов и гидроксикоричных кислот в траве *Tagetes erecta* L., *Tagetes patula* L. и *Tagetes tenuifolia* Cav. методом ВЭЖХ [Электронный ресурс] / С. М. Марчишин, Т. С. Бердей, С. С. Козачок, О. Л. Демьяк // Медицина и образование в Сибири : сетевое науч. изд. – 2013. – № 6. – Режим доступа : [http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1205](http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1205).

4. Медведев Ю. В. Исследование содержания фенолокислот в лекарственном и пищевом растительном сырье методом ВЭЖХ : автореф. дис. на соискание учен. степени канд. фармац. наук / Ю. В. Медведев. – М., 2010. – 24 с.

5. Пат. 109891 Україна, МПК (2016.01) A23F 3/34 A61K 36/52, A61K 36/533 A61K 36/704 A61K 36/73 A61P 13/10. Збір лікарських рослин з діуретичною і нефропротекторною дією / Марчишин С. М., Дорошенко О. Г., Козир Г. Р., Койро О. О., Чорна Н. С. ; заявники і патентовласники Марчишин С. М., Дорошенко О. Г., Козир Г. Р., Койро О. О., Чорна Н. С. – u2016 03360 ; заявл. 31.03.16 ; опубл. 12.09.16, Бюл. № 17.

6. Практикум по фармакогнозії : учеб. пособ. для студ. вузов / [В. Н. Ковалев, Н. В. Попова, В. С. Кис-

личенко и др.] ; под общ. ред. В. Н. Ковалева. – Харьков : Изд-во НфаУ : Золотые страницы, 2003. – 512 с.

7. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO / Renate Spitaler, P. Daniel Schlorhauser, Ernst P. Ellmerer [et al.] // *Phytochemistry*. – 2006. – **67**. – P. 409–417.

8. Gudej J. Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus L.* species / J. Gudej, M. Tomczyk // *Arch. Pharm. Res.* – 2004. – **27**, № 11. – P. 1114–1119.

9. Determination of Caffeoylquinic acids and flavonoids in *Cynara scolymus L.* by high performance liquid chromatography / M. Häusler, M. Ganzera, G. Abel [et al.] // *Chromatographia*. – 2002. – **56**. – P. 407–411.

О. Г. Дорошенко, С. М. Марчишин

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

## ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СБОРА ДИУРЕТИЧЕСКОГО

### Резюме

Изучен химический состав сбора диуретического. Установлено наличие и определено количественное содержание веществ фенольного характера: флавоноидов, гидроксикоричных кислот, кумаринов. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии идентифицированы хлорогеновая, розмариновая, феруловая кислоты, рутин, гиперозид, изокверцитрин, лутеолин, апигенин, кумарин, умбеллиферон и скополетин, установлено их количественное содержание.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сбор диуретический, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, кумарины.

О. Н. Doroshenko, S. M. Marchyshyn

I. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

## PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF DIURETIC COLLECTION

### Summary

Chemical composition of diuretic collection was studied. The presence of phenolic substances namely flavonoids, hydroxycinnamic acids and coumarines was proved. By HPLC method rutin, hiperoside, isoquercetin, luteolin, apigenin, coumarin, umbelliferon, scopoletin, chlorogenic, rosmarinic and ferulic acids were identified and their content was set.

KEY WORDS: diuretic collection, flavonoids, hydroxycinnamic acids, coumarines.

Отримано 02.08.16

Адреса для листування: С. М. Марчишин, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: svitlanafarm@ukr.net.